

201103004B

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業

コムギ無細胞タンパク質合成法を
活用したマラリアワクチン候補抗原の
網羅的探索技術の開発に関する研究

(H 21 - 地球規模 - 一般 - 005)

平成 21 年度～ 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業

コムギ無細胞タンパク質合成法を
活用したマラリアワクチン候補抗原の
網羅的探索技術の開発に関する研究

(H21 ー地球規模 ー一般 ー005)

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 坪 井 敬 文

平成24(2012)年5月

目次

I. 総合研究報告

コムギ無細胞タンパク質合成法を活用したマラリア ワクチン候補抗原の網羅的探索技術の開発に 関する研究	坪井敬文 --- 1
--	------------

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 38
--------------------	----------

III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 54
------------------	----------

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業)

総合研究報告書

コムギ無細胞タンパク質合成法を活用したマラリアワクチン候補抗原の網羅的
探索技術の開発に関する研究

研究代表者 坪井敬文

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授

研究要旨

マラリア撲滅が2007年に再度宣言されて以来、マラリアワクチン開発は最重要世界保健課題の一つとして再認識された。そのためには、既知のワクチン候補のみの研究では限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が喫緊の課題となっている。本研究は、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に実施した。まず基盤技術として、ビオチン化タンパク質ライブラリーの作成法、及び高感度かつハイスループットな抗原抗体反応スクリーニング法(アルファスクリーン法)を開発することに成功した。さらに本法を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質ライブラリーを構築したところ、熱帯熱マラリア原虫遺伝子を何ら改変することなくゲノムワイドに組換えタンパク質として発現することに成功した。また、防御抗体を保有するヒト血清を選択するために必要な熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系を確立した。それを用いて、マリ共和国の高度流行地住民から得たマラリア免疫成人血清の熱帯熱マラリア増殖阻害活性を測定し、その血清サンプルの内10名分を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質ライブラリーから抗原タンパク質の絞り込みを試行した。その結果、抗体価と原虫増殖阻害活性が正に相関し、ヒトに防御抗体を誘導している可能性のある原虫抗原を同定することが出来た。さらに、ネズミマラリアを用いた *in vivo* ワクチン効果判定系もLDHアッセイ系を用いて高速化することが出来、マラリアワクチン候補抗原の評価系として実施可能なことも示された。さらに、コドン改変することなく熱帯熱マラリア原虫全遺伝子5400種類の内、30%以上をカバーする1699種類を組換えタンパク質として合成することに成功した。これにアルファ

スクリーン法を応用し、高速免疫スクリーニングシステムの技術基盤を確立した。また本スクリーニングの準備のため、マリ共和国の高度流行地住民から得たマラリア免疫成人血清 10 人分、およびブルキナファソの小児から得られた血清 18 人分を用いて、1699 種のタンパク質ライブラリーから抗原タンパク質の絞り込みを試行した。その結果、今後のスクリーニングに有用であると考えられる 384 種のタンパク質を選択できた。また、同定された候補分子の二次スクリーニングのため、FACS を応用した熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系を確立した。以上より、新規赤血球期マラリアワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索が可能となる準備が完了した。さらに、マラリア原虫の蚊を介した伝搬を標的とした伝搬阻止ワクチンの候補抗原の探索をネズミマラリア実験系により試行したところ、2 種類の新規候補分子を同定できた。さらに、リポソーム（人工膜）で内包された膜蛋白質を基質にした抗原抗体反応を検出できる実験系の構築を行い、マラリアワクチン候補となりうる新規膜タンパク質抗原のスクリーニングをゲノムワイドに可能とする技術基盤の構築を行った。また、分子の機能に依拠したワクチン候補探索技術の有用性も検証した。赤血球侵入時に機能している可能性のある原虫分子 77 種に対する抗体を作製し、FACS を応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系を用いてワクチン活性を検証した。その結果、4 種の既知のワクチン候補抗原及び 3 種の新規ワクチン候補抗原、計 7 種類に対する抗体が熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害した。したがって、免疫スクリーニングに加えて、機能に依拠したワクチン候補探索技術によっても、これまで難渋していた新規マラリアワクチン候補タンパク質の探索が可能と考えられた。また、上記の新規ワクチン抗原の一つ GAMA に対する抗体は伝搬阻止活性を有することが、ネズミマラリア *in vivo* 評価系を用いて確認された。したがって、GAMA は一つの抗原で赤血球期及び伝搬阻止ワクチンとなる、つまり、これまでマラリアワクチンでは全く報告のない、単一抗原多価ワクチン候補であることが示唆された。以上より、新規マラリアワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索が可能となる技術基盤が確立したと考えられた。

研究分担者名

遠藤弥重太	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター	教授
澤崎達也	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター	准教授
竹尾 暁	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター	講師

鳥居本美	愛媛大学大学院医学系研究科	教授
石野智子	愛媛大学大学院医学系研究科	准教授
橘 真由美	愛媛大学大学院医学系研究科	助教
大槻 均	愛媛大学大学院医学系研究科	助教

研究協力者名

三浦憲豊 米国国立アレルギー・感染症研究所 主任研究員

A. 研究目的

マラリア撲滅が2007年に再度宣言されて以来、マラリアワクチン開発は最重要課題として認識された。そのためには、これまで研究が進められてきたわずかな数の既知ワクチン候補の研究のみでは限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が喫緊の課題となっている。しかし大腸菌等既存の方法ではマラリア原虫タンパク質合成の成功率が低く、マラリアゲノム情報の活用には大きな障害となっていた。我々が開発したコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法は、生きた細胞を使わず試験管内で組換えタンパク質を合成できる革新的な新技術である。そこで本研究は、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いてマラリア原虫のゲノムワイドなプロテインアレイを作製し、さらにそれを用いたハイスループット免疫スクリーニングシステムも構築し、新規ワクチン候補抗原を高効率に同定することを目的に実施した。本研究において新規のワクチン候補抗原が同定できれば、国際的なマラリアワクチン研究開発を先導することが期待できる。さらに本研究で同定された新規ワクチンが実用化されれば、乳幼児や妊産婦死亡の減少のみならず、

医療費、労働力の損失等、発展途上国における経済的負担を軽減するという国際的最優先課題について、我が国のプレゼンスを高めることにつながることを期待される。

B. 研究方法

1) タンパク質のビオチン化技術の開発
ゲノムワイドな組換えタンパク質ライブラリーを用いて特異的な抗原抗体反応を検出するため、コムギ無細胞系で合成したビオチンリガーゼ、およびビオチン化合物をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系に加えることにより、タンパク質の特異的部位へのビオチン化を試み、その至適条件を検討した。

2) 未精製ビオチン化タンパク質を用いた抗原抗体反応検出
抗原のエピトープが既に同定されている p53 タンパク質とそのモノクローナル抗体をモデルに用いて、アルファスクリーン法における抗原抗体反応のパフォーマンスを検討した。

3) マウスプロテインライブラリーを用いた自己抗原の同定

マウス遺伝子の中から、既知の自己抗原および自己免疫感受性遺伝子座上にコードされた遺伝子を229種類選別し、ビオチン化されたマウスタンパク質ライブラリーを作製した。それらを自己免疫疾患モデルマウスもしくは健常

マウスの血清を用いて、アルファスクリーン法により抗原抗体反応を検出した。

4) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質の内マラリア原虫の赤血球期にのみ発現が予想されている遺伝子 1600 クローンを選択した。それぞれからコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化組換えタンパク質ライブラリーを合成した。

5) ハイスループット抗原抗体アッセイ

これらのビオチン化組換えタンパク質ライブラリーとマラリア感染者血清との抗原抗体反応を検出するため、アルファスクリーン法を応用した上記高速免疫スクリーニングシステムを確立した。本年度は作製した 1600 種類の組換えタンパク質のうち、より早期に合成が完了していた 744 種と下記のマリ共和国ヒト免疫血清を用いて抗原タンパク質の絞り込みを実施した。

6) マリ共和国におけるマラリア流行地からのヒト血清試料の入手

熱帯熱マラリアに対する防御免疫を保有していると考えられる血清は、米国立アレルギー・感染症研究所の三浦憲豊博士の協力により、アフリカ、マリ共和国のマラリア流行地において採取していた 52 人分を、同研究所の許可を得て入手した。

7) 熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系の確立

より迅速で簡便な熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系を原虫 LDH 活性の測定を用いて確立し、上記マリ共和国マラリア免疫成人血清 52 人分の原虫増殖阻害率を測定した。

8) LDH アッセイ系を用いた迅速かつ簡便な *in vivo* ワクチン効果判定法の確立

ネズミマラリア原虫由来 LDH 活性によ

る感染原虫率の測定と、顕微鏡法による結果を比較し、さらに既知抗原 MSP1 をモデルとして用いて、そのワクチン効果を判定した。

8) 抗原抗体反応系の自動化

分注精度と分注スピードに優れた高機能分注機 (JANUS、パーキンエルマー社) を導入し、再現性と精度の高いプロトコール作成のための条件検討を行った。特に、分注液量、混合のためのピペッティング回数、分注回数を中心に検討した。

9) ヒト血清を用いたモデル抗原抗体反応検出

前年度のマウス血清を用いた至適化に引き続き、ヒト血清を用いて、既存の p53、ヒストンなどの自己抗原タンパク質を用いて、検出条件を調べた。その方法論として、ビオチン化 p53 もしくはヒストンの濃度検討、ヒト血清濃度検討を行い、アルファスクリーン法による抗原抗体反応至適条件を調べた。

10) 熱帯熱マラリア原虫赤血球期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、本研究に用いる赤血球期熱帯熱マラリア原虫のビオチン化組換えタンパク質数を昨年度よりも増加させ、合計 1699 種類とした。

11) ハイスループット抗原抗体アッセイを用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイの絞り込み

これらのプロテインアレイとマラリア感染者血清との抗原抗体反応の検出には、アルファスクリーン法を応用した高速免疫スクリーニングシステムを用いた。上記 1699 種類の組換えタンパク質と、マリ共和国成人免疫血清 10 名分に加えて、ブルキナファソの小児から得られた血清 624 種のうち 18 名分を用いて抗原タンパク質の絞り込みを実施した。

1 2) ブルキナファソにおけるマラリア流行地からのヒト血清試料の入手

アフリカの高度マラリア流行地では、成人になるとほぼ全てのヒトはマラリア防御免疫を獲得している。したがって、蚊からの感染率が均一な同一流行地域において「防御免疫有り」および「防御免疫無し」のヒトから本研究に役立つ血清試料を得るためには、まだ完全に防御免疫が獲得されていない小児を対象としたコホート研究が必要である。したがって、厳密な研究により熱帯熱マラリアに対する防御免疫の有無が評価されたヒト血清は、西アフリカ、ブルキナファソのマラリア流行地において米国国立アレルギー・感染症研究所が実施していたコホート研究対象者から得た。312人の小児から、流行期の前と流行期間中の2回採血していた血清計624サンプルを、米国国立アレルギー・感染症研究所の許可を得て入手した。

1 3) ネズミマラリア原虫モデルを用いたマラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索

ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) をモデルとし、蚊へ感染することのできるマラリア原虫生殖母体にのみ発現する分子で細胞表面に発現していると考えられるもの20を選択した。それらの候補分子をクローン化し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法によって組換えタンパク質を作製し、動物に免疫することで、抗血清を作製した。

これらの抗血清の伝搬阻止活性を、(i) *P. yoelii* に感染させたマウスを用いた受動免疫実験、および (ii) membrane feeder を用いた in vitro 吸血実験により評価した。

1 4) 機能的ビオチン化プロテオリポソーム膜蛋白質との抗原抗体反応検出系の構築

リポソーム添加型コムギ無細胞蛋白質合成系にビオチン化脂質を混合することにより、ビオチン化リポソームの作製を行った。アルファスクリーン法を用いてビオチン化膜蛋白質に対する抗原抗体反応測定系の作製を行った。

1 5) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成及び特異抗体の作製

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、赤血球への侵入型であるメロゾイト期の組換えタンパク質を193種合成し、それらに対する抗体を作製した。

1 6) FACS を応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系によるワクチン候補抗原の探索

上記193種類の抗体のうち、77種類の抗体について、IgGを精製し、FACSを用いた熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性測定系を用いて原虫増殖阻害活性を測定した。

1 7) ネズミマラリア原虫モデルを用いたマラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索

ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) をモデルとし、抗体の伝搬阻止活性を、*P. yoelii* に感染させたマウスを用いた受動免疫実験により評価した。

(倫理面への配慮)

本研究でのヒト血清試料の使用は、既に愛媛大学医学部臨床研究倫理審査委員会にて承認されている(「患者血清を用いた新規マラリアワクチン抗原の同定」、承認番号: 愛大医病倫1007002号)

・疫学研究に関する倫理指針

該当有
・動物実験等の実施に関する基本指針

該当有
・遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律

該当有

C. 研究結果および考察

1) タンパク質のビオチン化技術の開発
コムギ胚芽無細胞系にビオチン化技術を融合することにより、非常に高効率(70~90%)に目的のタンパク質のみにビオチンを付加することが分かった。また、その未精製ビオチン化タンパク質を用いて、アルファスクリーン法による抗原抗体反応が可能であることが分かった。

2) 未精製ビオチン化タンパク質を用いた抗原抗体反応の検出

ビオチン化 p53 を用いた、アルファスクリーン法による抗原抗体反応至適条件を調べたところ、0.5 pg/ μ L のタンパク質量を検出でき、血清中の 0.05% の抗体を同定でき、1 μ L の血清で 1000 種類の抗原抗体反応が可能なが分かった。

3) マウスプロテインライブラリーを用いた血清中に含まれる自己抗原の同定

アルファスクリーン法により、96 種類の自己免疫疾患モデルマウス特異的自己抗原を同定した。それらを Gene Ontology 解析を行ったところ、反応した自己抗原の多くは、膜タンパク質および自己免疫感受性遺伝子座上の遺伝子であることがわかった。ヒトの血清を用いても、ほぼ同じ条件で自己抗原の同定が可能である。

今後は、より多くの患者血清を用いて、系の至適化を行う。

4) 熱帯熱マalaria原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マalaria原虫メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子及び熱帯熱マalaria赤血球期原虫完全長 cDNA ライブラリーから、合計 1600 種類の組換えタンパク質を合成した。

5) マリ共和国ヒト血清試料の熱帯熱マalaria原虫 in vitro 増殖阻害活性測定の測定

マリ共和国ヒト血清試料の熱帯熱マalaria原虫増殖阻害活性を pLDH 法を用いて測定した。52 人分の血清試料の増殖阻害活性は、最高 92% から最低 4% と幅広く分布しており、中央値 43% であった。入手した血清サンプルは少量であるため、全種のタンパク質を用いた本スクリーニングに先行して、先ず 52 人分から 10 人分を選択して抗原タンパク質の絞り込みを行った。

6) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行および抗原の絞り込み

その結果、上記の組換えタンパク質の内 744 種類のうち、184 種のタンパク質が少なくとも 1 種の血清サンプルと反応し、その内 45 種のタンパク質で抗体価と増殖阻害活性が正に相関した。また、その内 16 種は、原虫表面への発現が予測されていた。

今後は、これまでに作製に成功した熱帯熱マalaria原虫タンパク質ライブラリーの全タンパク質 1600 種、血清試料を 52 種類用いて、解析を実施する。また、同定された新規の抗原に関しては、個別に動物を用いて抗血清を作製し、熱帯熱マalaria原虫 in vitro 増殖阻害活性測定系を用いてワクチン候補抗原の同定にすすめてゆく予定である。

7) LDH アッセイ系を用いた迅速かつ簡便な in vivo ワクチン効果判定法の確立

顕微鏡法でネズミマalaria原虫感染率を測定した感染赤血球検体を LDH アッセイ法で測定した所、両法の計測値は相関係数 0.98($p < 0.0001$)で有意に正相

関し、LDH アッセイ法が顕微鏡法と同等の測定精度を持つ測定系として有用である事が示された。

8) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成 MSP1 によるマウスの免疫と感染実験

コムギ胚芽無細胞系で合成した組換え MSP-1 で3回免疫したマウスの血清は、ELISA でネズミマラリア原虫 (*P. yoelii*) 抽出抗原と特異的に反応し、原虫由来の MSP-1 に対する抗体が産生されている事が示された。*P. yoelii* 原虫による感染実験では、MSP-1 免疫マウスは対照群と比べ、著明に低い感染率を示した ($p < 0.001$)。また、対照群では感染後8日までに全頭が死亡したのに対し、MSP-1 免疫マウスは75%のマウスが生存した。以上の結果からコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系による組換え MSP1 タンパク質は *in vivo* でも高いワクチン効果を示す事が明らかになった。

今後は、熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質と、流行地の患者血清によるスクリーニングで陽性となった原虫抗原タンパク質について、*P. yoelii* に相同体遺伝子があるものを組換えタンパク質として合成し、マウスに免疫して感染実験を行う事で、ワクチン効果のある原虫タンパク質の *in vivo* 探索を行う。基本的に抗体のみに依存する *in vitro* のアッセイ系と異なり、細胞性免疫などの多様な免疫系の関与が期待出来るマウスの *in vivo* 系は、さらに広範にワクチン候補抗原を発見できる可能性があると考えられる。

9) 抗原抗体反応系の自動化

最小の分注量は、5 μL の時、最も精度が良いことが分かった。また、混合のためのピペッティング回数、分注回数は多すぎると、結局、スループット性が下がることが分かったので、混合のためのピペッティングは3回を基本、基質タンパク質および血清分注で2回とし、各溶液の希

釈は自動ピペッティングで行うこととした。これらの、至適化したプロトコルを用いた再現性スコアは、0.9であった。これは、非常に再現性良く実験ができることを示している。これらの至適化により、1日6時間の実験で、384プレート25枚分、9,600反応数を処理できるようになった。

10) ヒト血清を用いたモデル抗原抗体反応検出

ビオチン化 p53 もしくはヒストンを用い、アルファスクリーン法によるヒト血清の抗原抗体反応至適条件を調べたところ、0.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ のタンパク質量を検出でき、血清中の 0.05% の抗原を同定でき、1 μL の血清で1000種類の抗原抗体反応が可能なが分かった。

11) ハイスループット抗原抗体アッセイを用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイの絞り込み

熱帯熱マラリア原虫全ゲノム 5400 中 1699 種類 (全ゲノムの 30% 以上をカバー) の赤血球期分子を含むプロテインアレイを用いて、マリ共和国から得られた 10 名分、およびブルキナファソから得られた 18 名分のヒト血清との反応性をハイスループット抗原抗体アッセイ法により検討した。その結果、1699 種のプロテインアレイの内、マリまたはブルキナファソ計 28 種の血清試料の何れとも反応性の低いタンパク質が約 1000 種類存在していることが明らかとなった。そこで、今後の大量の血清試料を用いた免疫スクリーニング効率を上げるため、ハイスループット抗原抗体アッセイで用いる 384 穴プレートにあわせて、384 種類にまでプロテインアレイに載せる組換えタンパク質の数を絞り込むこととした。その絞り込み基準は、得られている種々の情報

のうち、下記の条件に合致するものを優先的に選択した。(i)これまでのタイの血清を用いた免疫スクリーニングで、タイ血清中の防御免疫と正の相関が認められていた分子、(ii)10種類のマリ血清の熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性と抗体価の間に正の相関が認められた分子、および18種類のブルキナファソ血清の臨床的防御免疫と正の相関が認められた分子、(iii)抗体価の比較的高い分子、(iv)マラリアゲノムデータベース上でシグナル配列または膜貫通ドメインの存在が予測され、原虫表面に存在する可能性の高い分子。現在これらの条件を満たす分子 384 種類の選択を終了した。

12) FACS を用いた迅速かつ簡便な *in vivo* マラリア原虫増殖阻害効果判定法の確立

FACS 法、pLDH 法および顕微鏡法によるマラリア原虫増殖阻害活性測定結果を比較検討した。その結果、FACS 法を用いて得られた熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性は、顕微鏡法及び pLDH 法の何れとも正の相関を示し、しかも、FACS 法のみで「侵入阻害活性」と「成長阻害活性」が区別できることが判明し、FACS 法が最もハイスループットで今後の研究に有用な方法であると考えられた。

今後は、これまでに絞り込みに成功した熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイ 384 種、マリ 52 種、ブルキナファソ 624 種、合計 676 種の血清試料を用いて、本解析を実施する。また、同定された新規の抗原に関しては、個別に動物を用いて抗血清を作製し、FACS による熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 増殖阻害活性測定系を用いてワクチン候補抗原の同定をすすめてゆく予定である。

1 3) ネズミマラリア原虫モデルを

用いたマラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索

ネズミマラリア原虫のプロテオームデータを参照し、生殖母体で発現している 2560 個のタンパク質から 20 種類の候補抗原を選択した。それらの組換えタンパク質を無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、抗血清を得た。抗体価は ELISA で評価し、特異性は、western blotting 及び間接蛍光抗体法で解析した。18 種類の分子に対する抗体の確認が終了した。

これらの抗血清の伝搬阻止活性を、*P. yoelii* に感染させたマウスを用いた受動免疫実験により評価した。その結果、伝搬阻止効果が知られている Pys25 抗体を用いた時に、形成されるオーシスト数の有意な減少が認められたことから、伝搬阻止効果の評価系が確立できたと判断した。この実験系を用いて、18 種類の抗血清の伝搬阻止効果を解析したところ、2 種類が伝搬阻止活性を有することが判明した。

また、よりスループットの高い membrane feeder を用いた *in vitro* 吸血実験系の確立を試みたところ、吸血蚊一匹のオーシストの平均値が 500 を越える高い感染効率を与える系が確立できた。今後順次

Membrane feeding の系に移行し、得られた候補抗血清／抗体の伝搬阻止効果を測定する予定である。また、伝搬阻止効果が確認されたら、ヒトマラリア原虫の相同分子に対する特異抗体を作成し、伝搬阻止効果を測定する。これにより、ヒトマラリア伝搬阻止ワクチンの新規抗原の同定が可能となる。

1 4) 機能的ビオチン化プロテオリポソーム膜蛋白質との抗原抗体反応検出系の構築

これまで機能を保持した膜蛋白質

の合成は困難であった。リポソーム作製時にビオチン化脂質を混合する割合を至適化したところ、ビオチン化脂質を1～5%の間で混合すればアルファスクリーン法による検出が最大値になる機能性膜蛋白質の合成が可能であることが判明した。非標識リポソームでは、バックグラウンドレベルの測定値であることから、アルファスクリーン法を基盤とした本手法は、膜蛋白質を対象にした抗原抗体反応の検出に適していることがわかった。以上より、本手法が膜蛋白質を対象としたワクチン候補の探索に応用可能な技術として確立したと考えられる。

15) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成及び特異抗体の作製

マラリアゲノムデータベースからメロゾイトに強く発現していると予想された193種の遺伝子を選択した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成し、193種全ての組換えタンパク質に対する抗体を得た。

3) FACS を応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系によるワクチン候補抗原の探索

上記で作製した抗体の内、77種の抗体について、FACS を応用したマラリア原虫増殖阻害活性測定系を用いて、ワクチン活性を有する抗体を探索した。その結果、4種の既知のワクチン候補抗原 (AMA1, MSP1, EBA175, Rh5)、及び3種の新規ワクチン候補抗原 (PfGAMA, PfMSPDBL1, RALP1)、計7種類に対する抗体が増殖阻害活性を示した。

また、PfGAMA はヒト赤血球表面に結合し、この結合は既知の赤血球結合能を有するワクチン候補抗原 EBA175 とは異なり、赤血球表面のシ

アル酸には依存していないことが明らかとなった。したがって、PfGAMA (シアル酸非依存的) に対する抗体と、EBA175 (シアル酸依存的) に対する抗体を同時に作用させれば、それぞれの原虫増殖阻害活性を増強できるカクテルワクチン候補となる可能性が考えられた。そこで PfGAMA 抗体と EBA175 抗体を混合したところ、両者の混合により培養熱帯熱マラリア原虫の赤血球への増殖阻害活性が飛躍的に増強することが明らかとなった。以上の結果から、PfGAMA は熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入に重要な役割を果たすこと、さらに新規赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。

16) ネズミマラリア原虫モデルを用いた GAMA のマラリア伝搬阻止ワクチン活性の検証

PfGAMA オーソログをネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii* XNL) から探索し、PyGAMA とした。PyGAMA をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により合成し、抗体を作製した。Direct feeding 法を用いて、PyGAMA の抗体の伝搬阻止効果を検討したところ、統計学的に有意に蚊への感染を抑制した。したがって、GAMA はマラリア赤血球期ワクチンのみならず伝搬阻止ワクチン候補抗原ともなり得ることが示唆された。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を基盤とした、1) ビオチン化タンパク質ライブラリーの作成法、2) 高感度かつハイスループットな抗原抗体反応スクリーニング法を開発することに成功した。また、ネズミマラリア原虫を用いた in vivo 系も、迅速かつ簡便な LDH アッセイ法と組み合わせる事により、マラリアワクチン候補抗原の迅速な探索に有用である

事が示された。これにより、ゲノムワイドな新規マラリアワクチン候補抗原のスクリーニングが可能となる技術基盤ができた。次に、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を基盤とし、ビオチン化タンパク質ライブラリーを応用した高感度かつハイスループットな抗原抗体反応スクリーニング法をさらに改良した。また、1699 種類の熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイから 384 種類の抗原タンパク質に絞り込むことに成功し、大量の血清サンプルを使用した大規模免疫スクリーニングの準備が完了した。さらに、ネズミマラリア原虫を用いたマラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原探索法も確立した。これにより、ゲノムワイドな新規マラリアワクチン候補抗原のスクリーニングが可能となる技術基盤が確立した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を応用することにより、免疫スクリーニングに加えて、機能に依拠したワクチン候補探索技術も確立することが出来た。さらに、技術的に合成が非常に困難であった膜蛋白質も、探索の標的とすることが出来るようになった。さらに、ネズミマラリア原虫を用いたマラリアワクチン候補抗原の *in vivo* 評価系も確立した。これにより、ゲノムワイドな新規マラリアワクチン候補抗原のスクリーニングが可能となる技術基盤が確立した。以上より、これまで難渋していた新規マラリアワクチン候補タンパク質の探索がゲノムワイドに可能となった。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takai K, Sawasaki T, Endo Y.

Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. **Nature Protocols** 2010, 5:227-38.

2) Shimada H, Hirai K, Simamura E, Hatta T, Iwakiri H, Mizuki K, Hatta T, Sawasaki T, Matsunaga S, Endo Y, Shimizu S. Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acting as an NADH- dependent oxidoreductase. **The Journal of Biological Chemistry.** 2009, 284: 28642-9.

3) Nozawa A, Matsubara Y, Tanaka Y, Takahashi H, Akagi T, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. Construction of a protein library of arabidopsis transcription factors using a wheat cell-free protein production system and its application for DNA binding analysis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** 2009, 73:1661-4.

4) Igawa T, Fujiwara M, Takahashi H, Sawasaki T, Endo Y, Seki M, Shinozaki K, Fukao Y, Yanagawa Y. Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from Arabidopsis seedlings. **Journal of Experimental Botany.** 2009, 60:3067- 73.

5) Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. **BMC Plant Biology** 2009, 9: art. no. 39

6) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R,

- Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. **FEBS Letters**. 2009 583:1243-50.
- 7) Cao J, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. **Parasitology International**. 2009, 58:29-35.
- 8) Maeda T, Saito T, Harb OS, Roos DS, Takeo S, Suzuki H, Tsuboi T, Takeuchi T, Asai T. Pyruvate kinase type-II isozyme in *Plasmodium falciparum* localizes to the apicoplast. **Parasitology International**. 2009, 58:101-105.
- 9) Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology International**. 2009, 58:196-199.
- 10) Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 2009, 106:7167-7172.
- 11) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. **Parasitology International**. 2009, 58:243-248.
- 12) VanBuskirk KM, O'Neill MT, De La Vega P, Maier AG, Krzych U, Williams J, Dowler MG, Sacci, Jr. JB, Kangwanrangsang N, Tsuboi T, Kneteman NM, Heppner, Jr. DG, Murdock BA, Mikolajczak SA, Aly ASI, Cowman AF Kappe SHI. Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 2009, 106:13004-13009.
- 13) Jiang G, Shi M, Conteh S, Richie N, Banania G, Geneshan H, Valencia A, Singh P, Aguiar J, Limbach K, Kamrud KI, Rayner J, Smith J, Bruder JT, King CR, Tsuboi T, Takeo S, Endo Y, Doolan DL, Richie TL, Weiss WR. Sterile protection against *Plasmodium knowlesi* in rhesus monkeys from a malaria vaccine: comparison of heterologous prime boost strategies. **PLoS ONE**. 2009, 4(8):e6559.
- 14) Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, west central Africa. **The Journal of Infectious Diseases**. 2009, 200:1465-1469.
- 15) Hayakawa T, Arisue N, Udono T, Hirai H, Sattabongkot J, Toyama T,

- Tsuboi T, Horii T, Tanabe K. Identification of *Plasmodium malariae*, a human malaria parasite, in imported chimpanzees. **PLoS ONE**. 2009, 4(10):e7412.
- 16) Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T. Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research. **Expert Opinion on Drug Discovery**. 2009, 4:1191-1199.
- 17) Arakawa T, Tachibana M, Miyata T, Harakuni T, Kohama H, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Tsuboi T. Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in both passive and active vaccination regimens in a rodent model of malaria infection. **Infection and Immunity**, 2009, 77: 5496–5500.
- 18) Tetsutani K, Ishiwata K, Ishida H, Tu L, Torii M, Hamano S, Himeno K, Hisaeda H. Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice. **European Journal of Immunology**. 2009, 39:2822-30.
- 19) Nozawa A, Ogasawara T, Matsunaga S, Iwasaki T, Sawasaki T and Endo Y, Production and partial purification of membrane proteins using a liposome-supplemented wheat cell-free translation system. **BMC Biotechnology**. 2011, 11(1):35
- 20) Madono M, Sawasaki T, Morishita R and Endo Y, Wheat germ cell-free protein production system for post-genomic research, **New Biotechnology**. 2011, 28(3):211-7
- 21) Makino S, Sawasaki T, Endo Y, Takai K, Use of domain enzymes from wheat RNA ligase for in vitro preparation of RNA molecules, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2011, 404(4): 1050-4
- 22) Kanchiswamy C N, Muroi A, Maffei M E, Yoshioka H, Sawasaki T, Arimura G, Ca²⁺-dependent protein kinases and their substrate HsfB2a are differently involved in the heat response signaling pathway in *Arabidopsis*, **Plant Biotechnology**. 2010, 27(5): 469-73
- 23) Arimura G and Sawasaki T, Arabidopsis CPK3 plays extensive roles in various biological and environmental responses, **Plant Signaling and Behavior**. 2010, 5 (10): 1263-5
- 24) Tadokoro D, Takahama S, Shimizu K, Hayashi S, Endo Y and Sawasaki T, Characterization of a caspase-3-substrate kinome using an N- and C-terminally tagged protein kinase library produced by a cell-free system, **Cell Death and Disease**. 2010, 1, Article number e89
- 25) Matsuoka, K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T, Simple screening method for autoantigen proteins using the N-terminal biotinylated protein library produced by wheat cell-free synthesis, **Journal of Proteome Research**. 2010, 9: 4264–73

- 26) Makino S, Sawasaki T, Endo Y, Takai K, In vitro dissection revealed that the kinase domain of wheat RNA ligase is physically isolatable from the flanking domains as a non-overlapping domain enzyme, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2010, 397: 762-6
- 27) Matsunaga S, Matsuoka K, Shimizu K, Endo Y, Sawasaki T, Biotinylated-sortase self-cleavage purification (BISOP) method for cell-free produced proteins, **BMC Biotechnology**. 2010, 10, Article number 42
- 28) Nagamangala Kanchiswamy C, Takahashi H, Quadro S, Maffei M E, Bossi S, Berteza C, Atsbaha Zebelo S, Muroi A, Ishihama N, Yoshioka H, Boland W, Takabayashi J, Endo Y, Sawasaki T and Arimura G Regulation of Arabidopsis defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling, **BMC Plant Biology**. 2010, 97.
- 29) Takai K, Sawasaki T and Endo Y, The Wheat-Germ Cell-Free Expression System, **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 2010, 11(3): 272-8
- 30) Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y, Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H. Sawasaki T, Endo Y, Nose M, Evaluating the Role of Rheumatoid Factors for the Development of Rheumatoid Arthritis in a Mouse Model with a Newly Established ELISA System, **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. 2010, 220(3): 199-206.
- 31) Watanabe M, Miyazono K, Tanokura M, Sawasaki T, Endo Y and Kobayashi I, Cell-free protein synthesis for structure determination by X-ray crystallography. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:149-60.
- 32) Sawasaki T and Endo Y, Cell-free-based protein microarray technology using agarose/DNA microplate. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:63-72.
- 33) Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, Takeo S, Tsuboi T, Sattabongkot J, Han ET. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Acta Tropica**. 2010, 113: 61–65.
- 34) Tsuboi T, Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. An efficient approach to the production of vaccines against the malaria parasite. **Methods in Molecular Biology**. 2010, 607:73-83.
- 35) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. **Acta Tropica**. 2010, 114: 171-176.
- 36) Buates S, Bantuchai S, Sattabongkot J, Han ET, Tsuboi T, Udomsangpetch R, Sirichaisinthop J, Tan-Ariya P. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum*

- gametocytes.
Parasitol International. 2010, 59: 414-420.
- 37) Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kohama H, Tachibana M, Matsuzaki G, Torii M, Arakawa T.
Plasmodium vivax ookinete surface protein, Pvs25, linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization.
Infection and Immunity. 2010, 78: 3773-3782.
- 38) Blagborough AM, Yoshida S, Sattabongkot J, Tsuboi T, Sinden RE.
Intranasal and intramuscular immunization with baculovirus dual expression system-based Pvs25 vaccine substantially blocks *Plasmodium vivax* transmission.
Vaccine. 2010, 28: 6014-6020.
- 39) Chen JH, Jung JW, Wang Y, Ha KS, Lu F, Lim CS, Takeo S, Tsuboi T, Han ET.
Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays.
Journal of Proteome Research. 2010, 9: 6479-6489.
- 40) Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.** 2010, 107: 18640-18645.
- 41) Wang Y, Kaneko O, Sattabongkot J, Chen JH, Lu F, Chai JY, Takeo S, Tsuboi T, Ayala FJ, Chen Y, Lim CS, Han ET.
Genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* msp1p, a paralog of merozoite surface protein 1, from worldwide isolates. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene.** 2011, 84: 292-297.
- 42) Miyata T, Harakuni T, Sugawa H, Sattabongkot J, Kato A, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T, Arakawa T.
Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. **Vaccine.** 2011, 29:2720-2726.
- 43) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiattkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. **Parasitology International** 2011, 60: 132-138.
- 44) Chen JH, Wang Y, Ha KS, Lu F, Suh IB, Lim CS, Park JH, Takeo S, Tsuboi T, Han ET.
Measurement of naturally acquired humoral immune responses against the C-terminal region of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein using protein arrays. **Parasitology Research.** 2011, 109:1259-1266.
- 45) Doi M, Tanabe K, Tachibana SI, Hamai M, Tachibana M, Mita T, Yagi M, Zeyrek FY, Ferreira MU, Ohmae H, Kaneko A, Randrianarivelosia M, Sattabongkot J, Cao YM, Horii T, Torii M, Tsuboi T.
Worldwide sequence conservation of transmission-blocking vaccine candidate Pvs230 in *Plasmodium*

- vivax*. **Vaccine**. 2011, 29:4308-4315.
- 46) Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Muratova O, Macdonald NJ, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
N-terminal pro-domain of Pfs230 synthesized using cell-free system is sufficient to induce the complement dependent malaria transmission-blocking activity. **Clinical and Vaccine Immunology**. 2011, 18:1343-1350.
- 47) Farrance CE, Rhee A, Jones RM, Musiychuk K, Shamloul M, Sharma S, Mett V, Chichester JA, Streatfield SJ, Roeffen W, van de Vegte-Bolmer M, Sauerwein RW, Tsuboi T, Muratova OV, Wu Y, Yusibov V.
A Plant-Produced Pfs230 Vaccine Candidate Blocks Transmission of *Plasmodium falciparum*. **Clinical and Vaccine Immunology**. 2011, 18:1351-1357.
- 48) Rui E, Fernandez-Becerra C, Takeo S, Sanz S, Lacerda MV, Tsuboi T, Del Portillo HA.
Plasmodium vivax: comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. **Malaria Journal**. 2011, 10:192.
- 49) Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Ikehara A, Tachibana M, Torii M, Matsuzaki G, Arakawa T.
Tricomponent immunopotentiating system (TIPS) as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. **Infection and Immunity**. 2011, 79:4260-4275.
- 50) Sirichaisinthop J, Buates S, Watanabe R, Han ET, Suktawonjaroenpon W, Krassaesub S, Takeo S, Tsuboi T, Sattabongkot J
Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis in a field setting. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**. 2011, 85:594-596.
- 51) Arumugam TU, Takeo S, Yamasaki T, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Thompson J, Wilson DW, Beeson JG, Healer J, Crabb BS, Cowman AF, Torii M, Tsuboi T
Discovery of GAMA, a *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein, as a novel blood-stage vaccine candidate antigen. **Infection and Immunity**. 2011, 79:4523-4532.
- 52) Nozawa A, Fujimoto R, Matsuoka H, Tsuboi T, Tozawa Y.
Cell-free synthesis, reconstitution, and characterization of a mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carrier of *Plasmodium falciparum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2011, 414:612-617.
- 53) Cherif MS, Shuaibu MN, Kurosaki T, Helegbe GK, Kikuchi M, Yanagi T, Tsuboi T, Sasaki H, Hirayama K
Immunogenicity of novel nanoparticle-coated MSP-1 C-terminus malaria DNA vaccine using different routes of administration. **Vaccine**. 2011, 29:9038-9050.
- 54) Yildiz Zeyrek F, Palacpac N, Yuksel F, Yagi M, Honjo K, Fujita Y, Arisue N, Takeo S, Tanabe K, Horii T, Tsuboi T, Ishii KJ, Coban C.
Serologic markers in relation to

- parasite exposure history help to estimate transmission dynamics of *Plasmodium vivax*. **PLoS One**. 2011;6(11):e28126.
- 55) Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo CA. Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*. **PLoS One**. 2012;7(1):e30251.
- 56) Volz JC, Bártfai R, Petter M, Langer C, Josling GA, Tsuboi T, Schwach F, Baum J, Rayner JC, Stunnenberg HG, Duffy MF, Cowman AF. PfSET10, a *Plasmodium falciparum* methyltransferase, maintains the active var gene in a poised state during parasite division. **Cell Host & Microbe**. 2012;11(1):7-18.
- 57) Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate. **Vaccine**. 2012, 30:1807-1812.
- 58) Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. **Vaccine**. 2012, 30:1972-1980.
- 59) Bullen HE, Charnaud SC, Kalanon M, Riglar DT, Dekiwadia C, Kangwanrangsan N, Torii M, Tsuboi T, Baum J, Ralph SA, Cowman AF, de Koning-Ward TF, Crabb BS, Gilson PR. Biosynthesis, localisation and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins; PTEX. **The Journal of Biological Chemistry**. 2012, 287(11):7871-7884.
- 60) Ohnuki H, Inoue H, Takemori N, Nakayama H, Sakaue T, Fukuda S, Miwa D, Nishiwaki E, Hatano M, Tokuhisa T, Endo Y, Nose M, Higashiyama S, BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signalling in angiogenesis. **Blood**. 2012, 119(11) : 2688-98
- 61) Tsuge S, Mizutani Y, Matsuoka K, Sawasaki T, Endo Y, Naruishi K, Maeda H, Takashiba S, Shiogama K, Inada K, Tsutsumi Y, Specific in situ visualization of plasma cells producing antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in gingival radicular cyst. Application of the enzyme-labeled antigen method. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 2011, 59 (7): 673-689
- 62) Akagi T, Shimizu, K, Takahama S, Iwasaki T, Sakamaki K, Endo Y, Sawasaki T, Caspase-8 cleavage of the interleukin-21 (IL-21) receptor is a negative feedback regulator of IL-21 signaling. **FEBS Letters**. 2011, 585 (12): 1835-1840
- 63) Nemoto K, Seto T, Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y and Sawasaki T, Autophosphorylation profiling of Arabidopsis protein kinases using the cell-free system. **Phytochemistry**. 2011, 72 (10): 1136-1144
- 64) Arexandre JSF, Yahata K, Kawai S, Torii M, Kaneko O

- PEXEL-independent trafficking of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2 to the parasite-infected red blood cell and Maurer's clefts. **Parasitology International.**
- 65) Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Kaneko O. Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN4.2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. **Parasitology International.** 61:317- 323, 2012
2. 学会発表
- 1) Sawasaki T, Endo Y, Morishita R, Takai K, Membrane protein production and purification without affinity tag based on wheat germ cell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 2) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T, Functional production of malarial parasites' proteins with wheat germcell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 3) 船橋一世、澤崎達也、遠藤弥重太. Screening of human protein kinases binding to SOCS1 protein 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 4) 船橋一世、澤崎達也、遠藤弥重太. Screening of human protein kinases binding to SOCS1 protein 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 5) 清水康平、田所大典、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也. Cell biological analysis of TRB3 cleaved by caspase-3. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 6) 橋本季明、吉田茂生、澤崎達也、遠藤弥重太、吉川潮、鎌田真司. Screening of novel caspase substrates functioning at mitotic phase. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 7) 熱田翠薫、吉田篤司、吉崎慎二、八島さやか、松永智子、澤崎達也、梁明秀. Production and characterization of new monoclonal antibodies against human PD-1 that inhibit PD-1/PD-L1 interaction. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 8) 田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Complementary screening of Caspase-3-cleaved kinomeand the cell biological analysis of the new substances. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 9) 高濱正吉、澤崎達也、岡山明子、赤木達也、遠藤弥重太、山本直樹、梁明秀. 細胞極性抑制キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会. 名古屋、2009 年 11 月 26-28 日